



3/7/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009443237

WPI Acc No: 93-136754/199317

Luciferase modified with antigen, antibody, hapten or hormone, etc. - is isolated from *Vargula hilgendorffii*, useful in bio-luminescent analysis

Patent Assignee: TORAY IND INC (TORA )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 5064583	A	19930319	JP 9223899	A	19920210	C12N-009/02	199317
B							

Priority Applications (No Type Date): JP 9127183 A 19910221

Abstract (Basic): JP 5064583 A

Modified luciferase derived from *Vargula hilgendorffii* is composed by binding physiologically active substance, where the physiologically active substance is pref. (a) at least one kind of low molecular physiologically active substance i.e. antigen, hapten, hormone, enzyme substrate, receptor, sugar chain or coenzyme, or (b) high molecular physiologically active substance is antibody, enzyme, hormone and/or nucleic acid. The modified luciferase is used for bioluminescent analysis.

USE/ADVANTAGE - Enzymatic modification of luciferase derived from *Vargula hilgendorffii* with various kinds of physiologically active substance becomes possible. Direct application of the enzyme for various kinds of bioluminescent analysis is possible.

In an example,  $5.5 \times 10^{10}$  cps. (ca. 5 micro-g) recombinant luciferase was treated by PD-10 (RTM) column, and buffer was changed with 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.2M NaCl. After concn. to adequate liq. amt. by Centricon-10 (RTM), N-hydroxysuccinate-LC-biotin dissolved in 1/10 vol DMSO was added at mol ratio 400 fold, and reacted at room temperature for 4 hrs. under slow stirring. After reaction, it was treated by PD-10 column (RTM). Buffer was changed with 10 mM Na-phosphate (pH 7.2), 100 mM NaCl, at the same time, non-reacted biotininated reagent was removed. Lowering of enzymatic activity after reaction did not occur. (10pp Dwg.No.0/0)

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12N-009/02

International Patent Class (Additional): C12Q-001/66; C12Q-001/68;

G01N-021/76; G01N-033/532; G01N-033/535

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-64583

(43) 公開日 平成5年(1993)3月19日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/02		7823-4 B		
C 1 2 Q 1/66		6807-4 B		
G 0 1 N 21/76				
33/532	B-8310-2 J			
33/535	8310-2 J			

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-23899

(22) 出願日 平成4年(1992)2月10日

(31) 優先権主張番号 特願平3-27183

(32) 優先日 平3(1991)2月21日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 押原 渉

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会  
社基礎研究所内

(72) 発明者 小島 俊二

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会  
社基礎研究所内

(72) 発明者 中村 春次

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会  
社基礎研究所内

(54) 【発明の名称】 修飾ルシフェラーゼおよびそれを用いた生物発光分析方法

(57) 【要約】

【構成】 天然型あるいは組換え型ウミホタルルシフェラーゼにビオチン、抗体などの生理活性物質を結合させることにより得られる修飾ルシフェラーゼおよびそれを用いる生物発光分析方法。

【効果】 得られたルシフェラーゼは安定性に富み、各種の生物発光分析方法に用いることができ、とくに酵素免疫測定法、DNAプローブ法に用いられる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性物質を結合させるウミホタル由来の修飾ルシフェラーゼ。

【請求項2】 生理活性物質が抗原、ハプテン、ホルモン、酵素基質、レセプター、糖鎖、補酵素から選ばれた少なくとも1種の低分子生理活性物質である請求項1記載の修飾ルシフェラーゼ。

【請求項3】 生理活性物質が抗体、酵素、ホルモン、毒素、核酸から選ばれた少なくとも1種の高分子生理活性物質である請求項1記載の修飾ルシフェラーゼ。

【請求項4】 請求項1～3記載の修飾ルシフェラーゼを用いた生物発光分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、修飾酵素ルシフェラーゼに関する。さらに詳しくは、生物発光反応を用いた分析法に有効な、各種の生理活性物質で修飾されたウミホタルルシフェラーゼ蛋白質に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 生体成分の微量分析法として、化学発光や生物発光を用いることは、一般に高感度であり、NAD、NADH、ATP、過酸化水素などを生成する酵素系と組み合わせることにより、臨床化学分析に多用されている。最近では測定機器の開発が進み、多数の生体成分をピコモルからフェムトモル、アットモルのレベルで分析することが可能になってきた。また、これらの溶液系での発光分析に加えて、その高感度ゆえに画像解析、固定化酵素、酵素免疫測定法、DNAプローブ法、生物試験、バイオマスの測定、生体からの発光分析等の適用例が増加している（笠井、渡辺；蛋白質・核酸・酵素 32, 1234(1987)）。

【0003】 発光分析のうち、生物発光は、酵素系を触媒する化学発光と定義されているが、その量子収量は化学発光より圧倒的に高く、生物発光分析は、化学発光分析よりも感度の点で優れており、検出感度の鋭敏さでは、放射性同位元素を用いるラジオイムノアッセイに匹敵している。さらに、安全性や操作の手軽さ、測定装置として光電子増倍管があれば良く特殊な設備を必要としない事、危険な廃棄物を伴わないことなどの点からも非常に有益な方法である（今井 編 「生物発光と化学発光」 廣川書店 1990）。

【0004】 特に特異性の高い免疫反応と組み合わせた酵素免疫測定法に発光酵素を標識として用いた場合、①高感度であり微量成分の検出が可能で、②定量性の範囲の幅が広く、数オーダーにわたり、③光源が不要であるから迷光がなく、④反応が迅速で秒単位の短時間で分析できる特長を有すると考えられる。ホタルのルシフェラーゼを標識酵素とした酵素免疫測定法はすでに報告されていた（Wannlund, J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 440(1980)、Wannlund, J., DeLuca, 50

M.: Anal. Biochem., 122, 385(1982)) が、標識によりその活性が60～90%減少し、また標識体も短期間しか保存できないために実用には至っていない。この欠点を補うために他の標識酵素から発生した生成物をホタルやバクテリアのルシフェラーゼ反応と共役させることにより高感度検出を可能にした系がたくさん開発されている（Tanaka, K., Ishikawa, E.: Anal. Lett., 17(B18), 2025(1984)、Yabuuchi, M., Maeda, M., Tsujii, A.: 分析化学, 34, 6(1985)、Fricke, H., Strasburger, J., Wood, W. G.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 20, 91(1982)、Geiger, R. and Miska, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 25, 23, 30(1987)) が、当然の事ながらこれらの系では複雑さが増す。

【0005】 最近WO90/01542において、上記ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAの一次構造と蛋白質の一次構造が明らかにされ、さらに該ルシフェラーゼの発現ベクターを持つ動物細胞、酵母、大腸菌の大量培養により該酵素を安定的に生産させる方法が開示されたことにより、一定量の該酵素を供給することは可能になった。

【0006】 しかしながら、該ルシフェラーゼを生物発光分析に利用した例は見当たらず、上記の各種の微量分析法に適用するために必要な酵素修飾法の開発が望まれていた。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ウミホタル由来のルシフェラーゼを各種の生物発光分析に利用するために、該酵素に適当な生理活性物質を結合させる修飾法とそれによって得られる修飾ルシフェラーゼを提供することを目的とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 上述の課題を解決するために本発明は下記の構成を有する。すなわち本発明は、生理活性物質を結合させるウミホタル由来の修飾ルシフェラーゼおよびそれを用いた生物発光分析方法である。

【0009】 本発明によって修飾されるウミホタル・ルシフェラーゼはWO90/01542によって開示されたアミノ酸配列を有する蛋白質であるが、それと同等の生物活性が保持されているならば、該アミノ酸配列に部分的な置換、欠失、挿入などがなされていてもよい。

【0010】 本発明に用いるウミホタルルシフェラーゼを生産する方法としては、いかなる方法でも良く、例えば自然界より採集したウミホタルあるいは人工的に繁殖したウミホタルによって生産する方法、遺伝子組換え技術や細胞培養技術によりウミホタル以外の宿主細胞によって生産する方法、あるいは蛋白質合成技術により生産する方法などが挙げられる。

【0011】 次いで上記の方法により得られるルシフェラーゼ活性を含む酵素液より必要に応じてルシフェラー

ゼを精製する。該ルシフェラーゼの精製は、Thompsonらにより開示された方法 (Thompson, E. M. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6567(1989)) を用いて実施できるが、より好ましくは最終生成物をさらにDEAE-HPLCに掛け、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により純度を確認したものを用いる。

【0012】本発明でルシフェラーゼを修飾するのに用いる生理活性物質としては抗原、ハプテン、ホルモン、酵素基質、レセプター、糖鎖、補酵素などの低分子生理活性物質または抗体、酵素、ホルモン、毒素、核酸などの高分子生理活性物質が挙げられる。

【0013】一般に精製された蛋白質を生理活性物質で修飾する方法は数多く報告されており、蛋白質分子上のアミノ基、カルボキシル基、水酸基、SH基、糖鎖などを用いて実施できる (石川栄治 「酵素免疫測定法」第3版、石川ら 編、医学書院、75(1987)、石橋嘉一郎 「酵素免疫測定法」第3版、石川ら 編、医学書院、127(1987))。修飾したい分子によって方法が異なるものの、これらの方法を適用する際に注意すべきことは、修飾物の有する活性とルシフェラーゼの活性を保持したまま結合できる選択的な修飾反応を選び、しかもその反応は不要なルシフェラーゼの失活を避けるために緩和な条件下で完結させることである。

【0014】この条件を満たす修飾方法の1つとして、本発明で用いる低分子生理活性物質をルシフェラーゼに結合させる場合にスパーサーをはさんで両端にその低分子生理活性物質と反応性基を持つ試薬を使用してルシフェラーゼに低分子生理活性物質を導入する方法がある。また抗体やその他の蛋白質をルシフェラーゼに結合させる場合には、スパーサーをはさんで両端に同反応性あるいは異反応性の反応性基を持つ二価性試薬を使用して蛋白質蛋白質の複合体を形成させることができる。反応性基を持つ試薬の反応性基としては、数多くあるが代表的なものとして、ルシフェラーゼ上のアミノ基と反応するN-ヒドロキシサクシニミド・イミドエステル・ニトロアリールハライドなどが、チオール基と反応するマレイミド・ピリジンジスルフィド・チオフタルイミド・活性ハロゲン、紫外線照射によってアミノ基・チオール基いづれとも非選択的に反応するフェニルアジドやジアゾアルカンなどが利用できる (喜納兼男 「酵素免疫測定法」北川ら編、共立出版、335(1987))。

【0015】ウミホタル由来のルシフェラーゼの場合、WO90/01542によって開示されたアミノ酸配列によれば1分子当たり31のリジン残基、21のアルギニン残基、34のシステイン残基を有している。これらのアミノ基やチオール基のうち適当な基を利用して1分子当たり、平均1~30基、好ましくは1~4残基を修飾することにより、本酵素に他生理活性物質との反応性を持たせることが可能となる。例えば他の標識酵素の場合を例示すると、アミノ基を利用することにより、西洋ワ

サビエルオキシダーゼの1.6~1.7、グルコースオキシダーゼの3.3~6.2、アルカリホスファターゼの1.6~6.2、チオール基を利用することにより、β-ガラクトシダーゼの12の残基が1分子当たり修飾される (Eiji Ishikawa, J. Immunoassay, 4, 209(1983))。

【0016】このようにして作成した修飾ルシフェラーゼはその修飾形態により様々な生物発光分析に利用できると考えられる。代表的には、低分子生理活性物質としてビオチンをルシフェラーゼに結合したり、さらにそのビオチンを介してルシフェラーゼとアビジンまたはストレプトアビジンとの複合体を作成することにより、現在多用されている酵素免疫測定法、DNAプローブ法、免疫染色法、レセプター測定法などのビオチン・アビジンを利用した数々の検出系にルシフェラーゼによる発光分析法を加えることができる。またビオチン・アビジン以外にも明らかにしている酵素・基質、抗原・抗体、糖鎖・レクチン、毒素・レセプター、ホルモン・レセプター等のアフィニティー反応に関わる一成分でルシフェラーゼを修飾した場合、それに対応した他成分とルシフェラーゼとの複合体を形成することにより発光分析法に利用することができる。また、特に蛋白質蛋白質の複合体を形成させる方法によりルシフェラーゼと抗体との複合体を形成させた場合、酵素免疫測定法、DNAプローブ法、免疫染色法などにおける酵素標識抗体として利用できる。

【0017】上述の生物発光分析の中でもビオチンを結合させたウミホタル由来のルシフェラーゼを用いて、アビジンあるいはストレプトアビジンとの複合体を作成する酵素免疫測定法、DNAプローブ法および抗体を結合させたウミホタル由来のルシフェラーゼを用いた酵素免疫測定法が好ましく用いられる。

【0018】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】参考例

1. ウミホタル・ルシフェラーゼの取得

WO90/01542で開示された発現ベクターpGL1 (10μg) をプロトプラスト法 (Beggs, J.D.: Nature, 275, 104(1978)) により酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YSH2676 株 (a ura3-52 leu2-3 leu2-112 trp-1 pho3 pho5 his1-29) に導入して1×10<sup>6</sup>個の形質転換株を得た。pGL1はGAL1プロモーターの下流にルシフェラーゼcDNAが挿入された発現ベクターであり、このベクターを有するYSH2676の形質転換株は、ガラクトース存在下で大量のウミホタル・ルシフェラーゼを培地中に分泌できる。

【0020】この形質転換株を11の三角フラスコ中で100mlの培地 (Wikerham, L. J.: J. Bacteriol., 52, 293(1946)) を用いて、30℃で2日間振盪培

養した。この培養液200mlを400lの醗酵槽に添加し、180lの培地を用いて30℃で一夜培養して600nmの吸光度が10まで上昇したことを確認した後に、20lの200g/lガラクトースを添加してさらに7日間23℃で通気培養した。培養終了後に培養液を8,000rpm、10分間、4℃で遠心して菌体を分離して得られた培養上清を粗酵素液とした。

【0021】溶液中のルシフェラーゼ活性は、適量の酵素を300μlの測定用緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl)中に希釈した後に、2μlの33μMウミホタル・ルシフェリンとポリスチレン製の試験管(1.2×3cm)内で混合し、直ちにルミノメーター(西ドイツLumac社製、バイオカウンターM2010)を用いて光子数を10秒間測定した。発光強度は1秒あたりの平均光子数(cps)として示した。上記7日間培養後の培養上清中のルシフェラーゼ活性は $6 \times 10^4$  cps/lであった。

【0022】一方千葉県館山湾で採集したウミホタルを生理的食塩水で洗浄することにより、天然型のルシフェラーゼを得た。10gのウミホタルを洗浄したところ、 $3.0 \times 10^4$  cps活性に相当するルシフェラーゼが得られた。

【0023】2. ウミホタル・ルシフェリンの合成  
ウミホタル・ルシフェリンは、S. Inoue, S. Sugiura, H. Kakoi, T. Goto: Tetrahedron Lett., 1609(1969)で開示された方法に基づいて合成した。

【0024】3. ウミホタル・ルシフェラーゼの精製  
上記の方法で得られた粗精製のルシフェラーゼは、Tsujii, F. I.: Methods Enzymol. 57, 364(1987))にしたがって部分精製を行い、さらにThompsonらにより開示された方法(Thompson, E. M. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6567(1989))を用いて精製を進め、最終的には東ソー社製DEAE5PW(7.5mm×7.5cm)カラムを用いたHPLCにかけ、25mMリン酸ナトリウム、pH5.8、0.5MNaClで溶出させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳

動法によって単一の蛋白質であることを確認した。

【0025】精製されたルシフェラーゼを比較したところ、酵母により生産した組換え型ルシフェラーゼと天然型のルシフェラーゼとの間に比活性の差は見られず、どちらの酵素も $2 \times 10^4$  cps/mg蛋白質の比活性を有していた。

【0026】実施例1

1. ビオチン化ルシフェラーゼの作製

1-a. ルシフェラーゼのビオチン化

5.  $5 \times 10^4$  cps (およそ5μg)の組換え型ルシフェラーゼをファルマシア社製PD-10カラムにかけ、0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.2M NaClに緩衝液を交換した。アミコン社製セントリコン-10を用いて適当な液量にまで濃縮した後に1/10容量のジメチルスルホキシドに溶解したピアス社製N-ヒドロキシコハク酸-LC-ビオチンをモル比で400倍になるように添加して室温下でゆっくりと攪拌しながら4時間反応させた。反応後にファルマシア社製PD-10カラムにかけ、緩衝液を10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaClに変えると同時に、未反応のビオチン化試薬を除いた。ビオチン化試薬を加えない場合に比べて、反応後の酵素活性の低下は見られなかった。

【0027】1-b. ビオチン化ルシフェラーゼの評価  
5μlのピアス社製固定化ストレプトアビジンゲルを $6.4 \times 10^4 \sim 3.2 \times 10^5$  cpsの上記ビオチン化ルシフェラーゼあるいは比較例として $1.6 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^4$  cpsの未修飾のルシフェラーゼと20μlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl中で混合し、室温下で1時間反応させた。反応後に遠心分離により上清を分取した後にゲルを同緩衝液で3回洗浄して未反応のルシフェラーゼを除去した。上清とゲルに含まれていたルシフェラーゼの活性を第1表と第2表に示した。

【0028】

【表1】

第1表 ビオチン化ルシフェラーゼのストレプトアビジンへの結合

ビオチン化ルシフェラーゼ 添加量 (cps)	上清 (cps)	ゲル (cps)	ビオチン化率* (%)
6. $4 \times 10^5$	1. $2 \times 10^4$	1. $3 \times 10^5$	92
1. $3 \times 10^6$	2. $2 \times 10^4$	2. $6 \times 10^5$	92
1. $9 \times 10^6$	3. $6 \times 10^4$	3. $7 \times 10^5$	91
2. $6 \times 10^6$	7. $1 \times 10^4$	4. $6 \times 10^5$	87
3. $2 \times 10^6$	9. $2 \times 10^4$	5. $1 \times 10^5$	85

$$* \text{ビオチン化率} (\%) = \text{ゲル (cps)} / \{ \text{ゲル (cps)} + \text{上清 (cps)} \} \times 100$$

[0029]

[表2]

第2表 未修飾ルシフェラーゼのストレプトアビジンへの結合

ビオチン化ルシフェラーゼ 添加量 (cps)	上清 (cps)	ゲル (cps)	ビオチン化率* (%)
1. $6 \times 10^6$	1. $2 \times 10^6$	516	0.04
3. $2 \times 10^6$	2. $4 \times 10^6$	482	0.02
4. $8 \times 10^6$	2. $6 \times 10^6$	940	0.04
6. $4 \times 10^6$	2. $9 \times 10^6$	3014	0.10
8. $0 \times 10^6$	3. $4 \times 10^6$	1584	0.05

$$* \text{ビオチン化率} (\%) = \text{ゲル (cps)} / \{ \text{ゲル (cps)} + \text{上清 (cps)} \} \times 100$$

## [0030] 実施例2

## 2. ルシフェラーゼ/ストレプトアビジン複合体の作製

## 2-a. ビオチン化ルシフェラーゼの作製

5.  $5 \times 10^{10}$  cps (およそ  $5 \mu\text{g}$ ) の組換え型ルシフェラーゼをファルマシア社製PD-10カラムにかけ、0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 、0.2M  $\text{NaCl}$  に緩衝液を交換した。アミコン社製セントリコン-10を用いて適量の液量にまで濃縮した後に1/10容量のジメチルスルホキシドに溶解したピラス社製N-ヒドロキシコハク酸-L-C-ビオチンをモル比で3.30あるいは300倍になるように添加して室温下でゆっくりと攪拌しながら4時間反応させた。反応後にファルマシア社製PD-10カラムにかけ、緩衝液を10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM  $\text{NaCl}$  に変えると同時に、未反応のビオチン化試薬を除いた。固定化ストレプトアビジンゲルを用いて評価したビオチン化率は

モル比と対応してそれぞれ8.21あるいは6.9%であった。

## [0031] 2-b. ルシフェラーゼ/ストレプトアビジン複合体の作製および評価

上記ビオチン化率の異なる3種類のビオチン化ルシフェラーゼ  $1.8 \times 10^9$  cps (およそ150ng) を2  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$  あるいは500ng (重量比13.7、3) のザイメット社製ストレプトアビジンと200  $\mu\text{l}$  の10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM  $\text{NaCl}$ 、0.25% (W/V) 牛血清アルブミン中で室温下ゆっくりと攪拌しながら1時間反応させた。反応後に酵素活性の低下は見られなかった。

[0032] 反応後のルシフェラーゼ/ストレプトアビジン複合体の評価は、ビオチン化チューブを作製してそれに対して結合したルシフェラーゼ活性を測定することにより行なった。ルシフェラーゼ測定用のポリスチレン

チューブに240 $\mu$ lの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClに溶解した2 $\mu$ g/mlの生化学工業社製ビオチン化抗ウサギIgGを添加して4℃下、一夜保温した。3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンで1回洗浄後に、2 $\times$ 10<sup>4</sup> cpsの活性を有する上記ルシフェラーゼ/ストレプトアビジン複合体を含んだ180 $\mu$ lの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンを添加し、室温下で1時間180rpmで攪拌した。3mlの\*

10 [表3]

第3表 ルシフェラーゼ/ストレプトアビジン複合体のビオチン化チューブへの結合

ビオチン化 ルシフェラーゼ (アビジンゲルへの結合率)	ルシフェラーゼ活性 (cps) ストレプトアビジン重量比		
	13	7	3
8%	325016	231906	53692
21%	740806	716399	525282
69%	759550	7587	2825

【0034】実施例3. ルシフェラーゼ/抗体複合体のIL-6EIA系への適用  
本例に用いた抗原IL-6と抗IL-6モノクローナル抗体: IG61は Ida, N. et al; Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 728(1989) に開示された方法を用いて調製した。また常法に従い、この抗原をヤギに免疫して抗血清を調製し、IL-6のアフィニティーカラムクロマトグラフィー法でポリクローナル抗体を精製して用いた。

【0035】3-a. マレイミド化ルシフェラーゼの作製  
100mM リン酸ナトリウム、pH7.0、100mM NaClに溶解した0.58mg/mlの精製された天然型ルシフェラーゼ溶液1mlに、N,N-ジメチルホルムアミドに溶解した10mg/mlのピアス社製 N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate 溶液4 $\mu$ lを添加し、室温下で30分間ゆっくりと攪拌した。反応後に同緩衝液を用いてファルマシア社製PD-10カラムにかけ、未反応の N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylateを除いた。Ishikawaの方法 (Ishikawa E., et al; J. Immunoassay, 4, 209(1983)) を参考にして求めたルシフェラーゼ1分子当たりのマレイミド基導入量は、1.3であった。このときルシフェラーゼの比活性は1.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cps/mg蛋白質であった。

【0036】3-b. 抗IL-6モノクローナル抗体の還元

10  
\*10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンで2回、さらに3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClで2回洗浄した後に300 $\mu$ lの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClを添加してルシフェラーゼ活性を測定した。各複合体がビオチン化チューブに結合して発光した結果を第3表に示す。

【0033】

100mM リン酸ナトリウム、pH6.0、100mM NaCl、5mMエチレンジアミン4酢酸ナトリウムに溶解した1.3mg/mlの抗IL-6モノクローナル抗体: IG61溶液750 $\mu$ lに、同緩衝液に溶解した0.1Mメルカプトエチルアミン75 $\mu$ lを添加して、37℃下で60分間保温した。反応後に同緩衝液を用いてファルマシア社製PD-10カラムにかけ、未反応のメルカプトエチルアミンを除いた。

【0037】3-c. ルシフェラーゼ/抗体複合体の作製

上記の方法で作製したマレイミド化ルシフェラーゼおよび還元化した抗IL-6モノクローナル抗体をアミコン社製セントリコン-10を用いてそれぞれ0.34mg/ml、0.62mg/mlになるまで濃縮した。1.3mlの該マレイミド化ルシフェラーゼ溶液と1.0mlの該還元化抗IL-6モノクローナル抗体溶液を混合して、4℃下で一夜ゆっくりと攪拌した。反応後の溶液をアミコン社製セントリコン-30を用いて500 $\mu$ l以下に濃縮した後、東ソー社製G3000SWカラム(0.78mm径 $\times$ 30cm)を用いたゲル濾過HPLCにかけ、ルシフェラーゼ活性を有する2つの大分子量分画(分画番号43および46)を分取した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認したところ、これら2つの分画の分子量は、およそ数10万およびおよそ20万であり、明らかに抗体とルシフェラーゼの複合体が形成されていることが判明した。

50 【0038】3-d. ルシフェラーゼ/抗体複合体を用

## いたIL-6の検出

アフィニティー精製した抗IL-6ポリクローナル抗体を10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClを用いて2μg/mlに調製して、240μlをルシフェラーゼ活性測定用のポリスチレンチューブに添加し、4℃下で一晩保温した。使用直前に3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンで1回洗浄してから用いた。このチューブに100μlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンに溶解した0~20pgのIL-6と1×10<sup>5</sup> cpsのルシフェラーゼ活性を有するルシフェラーゼ/抗体複\*

\*合体(分画番号43あるいは46)を添加して、室温下で180rpm、1時間攪拌した。3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンで2回、3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClで4回洗浄した後に、300μlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClを添加してルシフェラーゼ活性を測定した結果、第4表に示すように添加した抗原量に対応した発光量が得られた。

【0039】

【表4】

第4表 ルシフェラーゼ/抗IL-6抗体複合体によるIL-6検出

IL-6 (pg/ml)	ルシフェラーゼ活性(cps)	
	分画番号43	分画番号46
0	38374	21537
5	59281	28811
10	76867	41289
15	90967	50615
20	111174	61220

【0040】実施例4. ルシフェラーゼ/抗体複体のミオグロビンEIA系への適用

本例に用いた抗原ミオグロビンは米ケンブリッジメディカル社より、ヤギ抗血清は米カッセル社より、抗ミオグロビンモノクローナル抗体はイスラエルICN社より購入して用いた。また常法に従い、この抗原を米バイオラッド社製アフィゲル10で固定化し、上述の抗血清からアフィニティーカラムクロマトグラフィー法でポリクローナル抗体を精製して用いた。また前述のIL-6の例と同様の方法により、マレイミド化ルシフェラーゼの作製、抗ミオグロビンモノクローナル抗体の還元およびルシフェラーゼ/抗体複体の作製を行った。

【0041】アフィニティー精製した抗ミオグロビンポリクローナル抗体を10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClを用いて2μg/mlに調製して、240μlをルシフェラーゼ活性測定用のポリスチレンチューブに添加し、4℃下で一晩保温した。使用直前に3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH

7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンで1回洗浄してから用いた。このチューブに100μlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンに溶解した0~12ngのミオグロビンと1×10<sup>5</sup> cpsのルシフェラーゼ活性を有するルシフェラーゼ/抗体複体を添加して、室温下で180rpm、30分間攪拌した。3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaCl、0.25% (V/V) Tween-20で2回、3mlの10mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClで5回洗浄した後に、300μlの100mM リン酸ナトリウム、pH7.2、100mM NaClを添加してルシフェラーゼ活性を測定した結果、第5表に示すように添加した抗原量に対応した発光量が得られた。

【0042】

【表5】



第5表 ルシフェラーゼ/抗ミオグロビン抗体複合体によるミオグロビン検出

ミオグロビン (ng/ml)	ルシフェラーゼ活性 (n=2) (cps)	
0	13590	16003
4	17370	17258
15	29455	31129
60	76616	69706
120	144594	191096

【0043】実施例5. ルシフェラーゼ/抗体複体のC反応性蛋白質 (CRP) EIA系への適用

本例に用いた抗原CRPはカナディアンバイオテクニカル社より、ヤギ抗血清および抗CRPモノクローナル抗体は日本バイオテスト社より購入して用いた。また常法に従い、この抗原をバイオラッド社製アフィゲル10で固定化し、上述の抗血清からアフィニティーカラムクロマトグラフィー法でポリクローナル抗体を精製して用いた。また前述の例と同様の方法により、組換え型ルシフェラーゼからマレイミド化ルシフェラーゼを作製して、アフィニティー精製した抗CRPポリクローナル抗体との複合体を作製した。

【0044】チューブに結合したルシフェラーゼ活性は、300μlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl中で2μlの33μMウミホタルルシフェリンを添加後、10秒後から10秒間の発光量をルミノメーター (アロカ社製BLR-201) を用いて積算して測定した。

【0045】抗CRPモノクローナル抗体を10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaClを用いて40μg/mlに調製して、100μlをポリスチ

レンチューブ (ヌンク社製 スターチューブ (登録商標)) に添加し、4℃で一夜保温した。使用直前に5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl、1% (W/V) 牛血清アルブミンで1回洗浄してから用いた。このチューブに2.8×10<sup>7</sup> counts相当の上記ルシフェラーゼ/抗体複合体を含む100μlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl、0.25% (W/V) 牛血清アルブミンを添加後、同緩衝液を用いて0~640000ng/mlに調製した抗原CRP溶液をさらに1/20に希釈して5μl添加した。室温下で10分間攪拌後、5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaCl、0.05% (W/V) Tween-20で3回、5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mMNaClで2回洗浄した後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0046】その結果、第6表に示すように40~640000ng/mlの4桁以上の広い濃度にわたってCRP量に応じた発光量が得られた。

【0047】

【表6】

第6表 ルシフェラーゼ/抗体複合体によるC反応性蛋白質(CRP)の検出

C反応性蛋白質 (ng/ml)	ルシフェラーゼ活性 (counts)
0	36
40	102
160	326
640	838
2500	3185
10000	12941
40000	46363
160000	94594
640000	124116

【0048】実施例6. B型肝炎ウイルスDNAの検出  
本例においては、検体中のB型肝炎ウイルス(以下HBV) DNAを、RNAプローブとの間でDNA/RNAハイブリッド分子を形成させ、抗DNA/RNAハイブリッド認識抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法にて検出した例を提示する。

【0049】本例に用いたRNAプローブは、T.MANIATISら編、MolecularCloning(第二版)10.27項に記載されている方法にしたがって、HBV-DNAを鋳型とし、T7 RNA合成酵素によるin vitro転写反応を行い調製した。

【0050】HBV-DNAの全配列を含むプラスミドpT7-13HBVadrは、T.MANIATISら編、MolecularCloning(第二版)、6.3項に記載されている方法にしたがって、Fujiyama, A. et al; Nucleic Acids Res., 11, 4601(1983)に開示されていたHBV-DNAの全配列をT7プロモータ下流に組み込んで作製した。

【0051】本例で使用したモノクローナル抗体は、特開昭60-262055に開示された方法に基づきDNA/RNAハイブリッド分子を作製し、通常の方法にしたがってマウスを免疫して、ハイブリドーマを作製し、Iida, N. et al; Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 728(1989)に開示された方法で大量調製、精製して用いた。

【0052】また前述の例と同様の方法により、精製されたモノクローナル抗体をポリスチレン製のチューブに固定化してサンドイッチ酵素免疫測定法の固相として用いた。また、組換え型ルシフェラーゼからマレイミド化ルシフェラーゼを作製して、同抗体との複合体を作製し

た。チューブに結合したルシフェラーゼ活性は、実施例5と同様に測定した。

【0053】32.6mg/ml グアニジン塩酸を含む100μlのヒト血清中に溶解した0.05, 5, 50, 500 pgのpT7-13HBVadrに、50μlの1.25 N水酸化ナトリウムを添加して65℃に20分間保温した後、300 ng/mlのRNAを含む50μlの42mg/ml塩化ナトリウム、21.1 mg/mlクエン酸ナトリウム二水和物、20mMトリス塩酸、200mg/l フィコール400、200mg/l ポリビニルピロリドン、200mg/l 牛血清アルブミン、10% デキストラン硫酸、1%ドデシル硫酸ナトリウムを添加してさらに65℃に20分間保温してDNA/RNAハイブリッドを形成させた。室温に戻した溶液を、抗DNA/RNA抗体を固定化したポリスチレンチューブに移して室温下で1時間激しく攪拌してDNA/RNAハイブリッドをチューブに固定化した。攪拌後にチューブ内の液を捨て、各チューブに200μlの0.2mg/mlのリボヌクレアーゼAを加えて室温下で10分間静置した後、チューブ内の液を捨て、200μlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mM塩化ナトリウム、0.25% 牛血清アルブミンに溶解した1×10<sup>7</sup> counts相当のルシフェラーゼ標識抗DNA/RNAハイブリッド抗体を添加して10分間攪拌した。反応後に5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mM塩化ナトリウム、0.05%(W/V) Tween 20で3回、5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH7.2、100mM塩化ナトリウムで2回洗浄した後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、第7表に示すように、0~500 pgの添加したDNA量に応じたルシフェラーゼ活性を検出することができた。

【0054】

【表7】

第7表 ルシフェラーゼ/抗DNA/RNA抗体  
を用いたB型肝炎ウイルスDNAの検出

HBV DNA (pg)	ルシフェラーゼ活性 (counts/tube)
0	45
0.5	55
5	320
50	1799
500	16509

【0055】

【発明の効果】従来、各種のホタルルシフェラーゼやバクテリアのルシフェラーゼなどの生物発光酵素は、優れた特長を有しているにもかかわらず、その不安定性のために各種の酵素修飾法が適用されず、生物発光分析法のうちの限られた用途にのみ利用されていた。しかしなが

ら本発明により、各種の生理活性物質によるウミホタルルシフェラーゼの酵素修飾法が開示され、さらにそれを用いた各種分子への該酵素の結合を利用する方法が明らかになったことにより、酵素免疫法を初めとする様々の生物発光分析法に該酵素を直接的に適用し、その特長を遺憾なく発揮させる道が開けた。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 1 2 Q 1/68

A 8114-4B

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**